



APLICAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES: AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTIVO A BASE DE AMIDO

SILVA, Andreza Santos¹; VIEIRA, Isabela Maria Monteiro²; MOURA, Thaysa Maria de Freitas³; RUZENE, Denise Santos⁴; SOUZA, Roberto Rodrigues de⁵; SILVA, Daniel Pereira⁶

¹ Departamento de Engenharia de Produção, Universidade Federal de Sergipe, andreza.ss@live.com

² Departamento de Engenharia de Produção, Universidade Federal de Sergipe, trabalhos.daufs@gmail.com

³ Departamento de Engenharia de Produção, Universidade Federal de Sergipe, thaysamoura08@gmail.com

⁴ Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Sergipe, ruzeneds@hotmail.com

⁵ Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Sergipe, rrsouza@ufs.br

⁶ Departamento de Engenharia de Produção, Universidade Federal de Sergipe, silvadp@hotmail.com

Resumo: *O presente plano de trabalho teve por objetivo avaliar novas estratégias na elaboração de meios de cultivo para obtenção de biossurfactantes, meios estes constituídos por uso de amido e açúcares como glicose e sacarose. Para isso, foi realizado uma revisão da literatura e analisado as aplicações desses tensoativos, visto como uma alternativa mais eficiente e sustentável para o meio ambiente.*

Palavras-chave: biossurfactantes, substrato, bioprocesso.

BIOSURFACTANT APPLICATION: EVALUATION OF CULTURE MEDIA IN STARCH

Abstract: *This work plan aimed to evaluate new strategies in the development of culture media to obtain biosurfactants, these means consist of the use of starch and sugars such as glucose and sucrose. For this, we performed a literature review and analysis applications of these surfactants, seen as a more efficient and sustainable alternative to the environment.*

Keywords: biosurfactants, substrate, bioprocess.

1. Introdução

Atualmente, uma das principais preocupações é a poluição em consequência de alguns hidrocarbonetos, por exemplo, o petróleo. Entretanto, o aumento da preocupação ambiental entre os consumidores, juntamente com novas legislações de controle do meio ambiente resultou na procura de alternativas aos produtos existentes.

Os surfactantes são moléculas anfipáticas, ou seja, possuem uma região hidrofílica (solúvel em meio aquoso), e uma região hidrofóbica (insolúvel em água, porém solúvel em lipídios e solventes orgânicos). Os surfactantes podem ser sintéticos ou biológicos (biossurfactantes). Quando sintéticos são produzidos através de uma síntese química, já os biossurfactantes são produzidos por microrganismos. Uma das atribuições dos surfactantes é reduzir a tensão superficial, assim podem ser usados na produção de detergentes, emulsificantes e espumas para as indústrias de alimentos, farmacêutica e química (MESSIAS, 2008). Além disso, os surfactantes são aplicados industrialmente como adesivos, flocculantes, espumantes, desemulsificantes e penetrantes, podendo ser usados também na extração de óleo. Porém, a indústria petrolífera é o ramo em que mais se utiliza os surfactantes. O potencial de recuperação dos substratos de petróleo deve-se a sua utilização na limpeza de tanques, preparo de misturas óleo-álcool para combustíveis e dispersão de óleos derramados em ambientes aquáticos (COLLA & COSTA, 2003).

Devido a maioria dos surfactantes químicos serem oriundos de derivados petrolíferos, os mesmos representam riscos ao meio ambiente. Os surfactantes naturais ou biossurfactantes constituem uma opção para substituir os surfactantes químicos nos produtos dos quais fazem parte (NITSCHKE & PASTORE, 2002). Os biossurfactantes, assim como os surfactantes sintéticos, são moléculas anfipáticas produzidos por diferentes microrganismos tais como bactérias, leveduras e fungos filamentosos na presença de diferentes fontes de carbono. A fonte de carbono influencia diretamente na qualidade do biossurfactante produzido, já que propicia alterações na composição química da molécula (SINGH *et al.*, 2007; GEORGIU *et al* 1992; MORAIS & ABUD, 2012). Além da influência da fonte de carbono, a qualidade do surfactante natural também é influenciada pelas características do fermentador, pelo pH do meio, pela composição dos nutrientes e pela temperatura do meio.

2. Revisão da Literatura

2.1. Surfactantes: definição

Novas estratégias estão sendo desenvolvidas para a obtenção de meios de cultivos de microrganismos. A literatura aponta uma ampla diversidade de fontes de carbono, entre elas o amido e os açúcares. Por outro lado, os surfactantes são compostos químicos de extrema importância para os setores indústrias. A partir dos 80, a procura por esses compostos cresceu consideravelmente (GREEK, 1990).

Os surfactantes são classificados como substâncias anfífilas, pois possuem uma parte polar e outra apolar. Os tensoativos ou surfactantes ainda podem ser classificados como: aniônicos, não iônicos e catiônicos, essa classificação vai estar relacionada com a carga exibida pela porção polar da molécula (MESSIAS, 2008).

Os tensoativos podem ser obtidos a partir da síntese química ou biológica. Segundo Ivshina (2016), os surfactantes sintéticos são tradicionalmente mais utilizados, apesar dos biossurfactantes apresentarem uma menor toxicidade e serem biodegradáveis.

A eficácia de um surfactante é definida pela sua capacidade de diminuir a tensão superficial. Tanto os surfactantes sintéticos e os biossurfactantes têm a capacidade de diminuir a tensão superficial da água (72 mN/m) para valores entre 47 e 27 mN/m (MESSIAS, 2008). Logo, a efetividade dos tensoativos está condicionada com as tensões superficiais as quais devem chegar em valores menores que 30 mN/m (GOUVEIA *et al.*, 2003).

Outro parâmetro que determina a eficácia do biossurfactante é a concentração micelar crítica (CMC), que consiste na menor concentração de surfactantes na água onde ocorre a formação de micelas. A CMC é influenciada pelo pH, temperatura e força iônica (OBERBREMER *et al.*, 1990; SAMSON *et al.*, 1990).

Os resíduos (substratos) normalmente utilizados são: açúcares, óleos, alcanos, resíduos industriais e agrícolas. Os biossurfactantes podem ser produzidos por processos simples, como: fermentação (BANAT *et al.*, 2000).

2.2. Tipos de biossurfactantes

Para Mesquita (2004), pode haver uma classificação dos biossurfactantes com relação a natureza bioquímica do composto. Eles podem ser categorizados como: glicolipídios, lipossacarídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos e ácido graxos.

O *Bacillus subtilis* produz o biossurfactante surfactina o qual é um excelente tensoativo com capacidade de diminuir a tensão superficial de compostos. A surfactina possui facilidade de formação e estabilização de espumas e atividade antimicrobiana. Esse tensoativo é recomendado pois consegue diminuir a tensão superficial da água em 27 mN/m (SAKTHIPRIYA, 2015).

Para a produção dos biossurfactantes podem ser utilizados diversos tipos de bactérias, como: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*. As bactérias termófilas, tal como *Bacillus subtilis*, mostra um grande potencial em ambientes industriais petrolífero, pois reagem bem a temperaturas elevada. Banat (1993) reportou o isolamento da *Bacillus* no meio contendo hidrocarbonetos e notou que a temperatura de 50°C permitia o crescimento. Zeng (2014) percebeu o crescimento de *Bacillus subtilis* a 28-55°C, e observou um crescimento limite, dada a 45°C. Droffner e Yamamoto (1985) observaram o crescimento ótimo do mesmo microrganismo a 68°C. Já Meng (2014) observou que o *Bacillus* pode crescer a 25-80°C, com o máximo de crescimento a 60°C. Mazar (2012) observou o crescimento da bactéria entre 36 e 60°C.

2.3. Aplicações

O potencial de aplicação dos biossurfactantes está relacionado com algumas propriedades que esses compostos apresentam, como: emulsificação, umedecimento, solubilização, demulsificação, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. O setor que mais utiliza esses tensoativos são as indústrias petrolíferas que empregam ais compostos em atividades como: utilização na limpeza de tanques, preparação de misturas óleo-álcool para combustíveis e dispersão de óleos derramados em ambientes aquáticos. O método de limpezas utilizando os biossurfactantes consiste no fundamento de emulsificação do óleo em água, em seguida o bombeamento dessa emulsão e por fim o recolhimento do óleo (COLLA, 2003).

Resíduos de óleos pesados que solidificam no fundo dos tanques podem se tornar um problema, quando não removido por bombeamento convencional. A remoção precisa de lavagem com solventes ou limpeza manual, que são constituem métodos caros e demorados. Um processo alternativo de limpeza é o uso de biossurfactantes que promovem a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões, facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru após quebra da emulsão (NITSCHKE e PASTORE, 2006).

A utilização de biossurfactantes em técnicas para melhoria do petróleo (MEOR) também são eficazes. Essa tecnologia consiste em recuperação terciária do petróleo que utiliza microrganismo ou produto do seu metabolismo para a recuperação do óleo residual. Esse mecanismo funciona, pois os microrganismos produzem polímeros e surfactantes que reduzem a tensão superficial da rocha e óleo, assim os óleos são removidos mais facilmente. Para a MEOR funcionar, os microrganismos selecionados devem ser aptos a se desenvolver em condições extremas (NITSCHKE & PASTORE, 2006). Segundo Nitchke e Pastore (2006), após uma comparação entre um biossurfactante e outros aditivos com objetivo da fitoremediação de solo contaminado com gasolina, os resultados mostraram que os tensoativos foram mais eficazes que os aditivos. Os dados mostraram que os biossurfactantes removeram até 93,5% do petróleo, enquanto os aditivos removeram em 85,4%.

A aplicação do biossurfactante surfactina na área farmacêutica é vasta, sendo usado para servir como inibidor da formação de coágulos, atividade antibacteriana e antifúngica; antiviral e antitumoral. Na agricultura, os tensoativos ou biossurfactantes produzidos pelos microrganismos *Pseudomonas sp.* e *Alcaligenes sp.* foram usados para flotação e separação de calcita e eschelita (NITSCHKE & PASTORE, 2006).

Mulligan *et al.* (2001) fizeram um experimento utilizando três tipos de biossurfactantes para a remoção de metais pesados a partir dos sedimentos. Surfactina produzida por *Bacillus subtilis*, ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* e soforolípido sintetizado por *Torulopsis bombicola*. Os biossurfactantes obtidos a partir dos microrganismos citados foram analisados usando o sedimento contaminado com metais (110 mg / kg de cobre e 3300 mg / kg de zinco). O ramnolipídio removeu 65% do cobre e 18% do zinco, já o soforolípido 25% do cobre e 60% do zinco. A surfactina foi menos eficaz, removendo apenas 15% do cobre e 6% do zinco. Portanto, a remoção de metais pesados dos sedimentos é viável.

Em razão da sua compatibilidade com a pele, os biossurfactantes podem ser usados em produtos de higiene e cosméticos. A KAO Co. Ltda, por exemplo, desenvolveu um processo fermentativo para produção de soforolipídios, que logo em seguida sofrem esterificação, resultando em um produto com utilização em batons e como hidratante para pele e cabelos. Normalmente, o papel dos emulsificantes em alimentos é estabelecer a estabilidade da emulsão, por meio do controle da aglomeração de glóbulos de gordura e estabilização sistemas aerados. Eles podem também promover a melhoria da textura e vida de prateleira de produtos contendo amido pela formação de complexos, modificando as propriedades reológicas da farinha de trigo, melhoria da

consistência e textura de produtos a base de gordura, além de promover a solubilização de aromas (BARROS *et al.*, 2007).

A aplicação dos biossurfactantes no setor alimentício também é eficaz. Foi feito um estudo, utilizando cascas de sésamo junto com o tensoativo com a finalidade de produzir uma farinha que pudesse substituir a farinha de trigo branca tradicional no preparo de biscoitos. As propriedades funcionais das farinhas de compósitos, como: capacidade de inchamento, a capacidade de retenção de água, capacidade de retenção de óleo, a capacidade de emulsionar, capacidade espumante, a temperatura de gelatinização, a concentração de gelificação menos e a densidade a granel foram aumentadas com o aumento nas cascas de sésamo. A farinha de casca de sésamo apresentou propriedades físicas interessantes como menor teor de umidade e maior fator de disseminação do que as feitas por farinha de trigo branca (ZOUARI, 2016).

Uma outra aplicação é na indústria de laticínios, onde atrasam a colonização de *Streptococcus Thermophilus*, que é responsável pelo mal cheiro ou gosto ruim durante a pasteurização (BANAT *et al.*, 2000).

2.4. Potencial do amido como fonte de carbono

Estruturalmente, o amido é um polissacarídeo composto por cadeias de amilose e amilopectina. A amilose e amilopectina são compostas por glicose e juntos formam uma estrutura ramificada. Esses polímeros podem ser classificados como, amido A ou B. O amido A são os polímeros de cadeia ramificada curta, por exemplo: cereais e grãos. Enquanto o amido B são os de cadeias longas, como: raízes e tubérculos. Além dessas duas classificações, existem os alimentos que são formados pela combinação do amido A e B, como: banana, algumas plantas e feijão (LI, 2016).

Segundo Colla (2003), foram realizados experimentos utilizando a Cepas de *Bacillus subtilis*. Esse microrganismo deu origem ao biossurfactante surfactina, o qual consiste em um lipopeptídio cíclico constituído de um ácido graxo de 14 a 15 carbonos ligado a um peptídio com 7 resíduos de aminoácidos. As fontes de carbono utilizada foram glicose, óleo de soja e por fim, o amido. Os resultados obtidos utilizando esses substratos foram bastante promissores, enquanto que com a glicose as tensões superficiais passaram de $71,3 \pm 0,1$ para $28,3 \pm 0,3$ mN/m, no meio rico em amido passou de $71,3 \pm 0,1$ para $27,5 \pm 0,3$ mN/m.

3. Considerações finais

Os biossurfactantes são compostos dotados de grande versatilidade já que podem ser aplicados em diferentes setores industriais além de possuírem características únicas que os tornam promissores substitutos dos nocivos surfactantes químicos. O uso do amido como fonte de carbono para microrganismos produtores de biossurfactantes é propício já que a análise da literatura permitiu averiguar que houve produção de surfactante natural na presente desse substrato. Todavia, novos estudos com diferentes microrganismos são necessários para ratificar o potencial do amido.

Referências Bibliográficas

- ABDEL-MAWGOUD, A.M.; ABOULWABA, M.M.; HASSOUNA, N.A.H. **Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.150, p.305–325, 2008.
- AKIYODE, O; GEORGE, D; GETTI, G; BOATENG, J. **Systematic comparison of the functional physico-chemical characteristics and biocidal activity of microbial derived biosurfactants on blood-derived and breast cancer cells**. Journal of Colloid and Interface Science.2016.
- BANAT, I.M. Banat **The isolation of thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp** Biotechnol. Lett., 15 (1993), pp. 591–594
- BANAT, I. M.; MAKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. **Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 53, n. 5 p. 495-508, 2000.
- BHANGE, K; CHATURVEDI, V; BHATT, R. **Simultaneous production of detergent stable keratinolytic protease, amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 using agro industrial waste**. Biotechnology Reports. 2016.
- BUENO, S.M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção caracterização e comportamento num sistema modelo**. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.
- COLLA, L; COSTA, J. **OBTENÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES**. 2003
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. **Surface-active agents from two *Bacillus* species**. Applied and Environmental Microbiology, v. 53, p. 224-229, 1987.
- DESAI, J.D.; BANAT, I.M. **Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential**. Microbiology and molecular biology reviews, p.47-64, 1997.
- Droffner and Yamamoto, 1985 M.L. Droffner, N. **Yamamoto Isolation of thermophilic mutants of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* and transformation of the thermophilic trait to mesophilic strains** J. Gen. Microbiol., 131 (1985), pp. 2789–2794
- DUBEY, K.; JUWARKAR, A. **Destillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactants production**. World Journal of Microbiology and Biotechnology. v.17, p.61-69, 2001.
- FOX, S.L.; BALA, G.A. **Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates**. Bioresource Technology, v.75, p. 235-240, 2000.
- GEORGIU, G.; LINS, S.C.; SHARMA, M.M. **Surface-active compounds from microorganisms**. Bio/Technology, v. 10, p. 60-65, 1992.
- GREEK, B. F. **Detergent Industry Ponders Product for New Decade**. Chemical Engineering News, v. 68, p. 37-38, 1990.

- HOMMEL, R.K.; WEBER, L.; WEISS, A.; HIMMELREICH, U.; RIKE, O.; KLEBER, H.P. **Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose**. Journal of Biotechnology, v.33, p.147-155, 1994.
- MAKKAR, S.S. **Cameotra Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain J**. Ind. Microbiol. Biotechnol., 18 (1997), pp. 37–42
- MAZAR et al. **Isolation, purification and characterization of a thermophilic alkaline protease from *Bacillus subtilis* BP-36**. Journal of Sciences. Islamic Repub. Iran pp. 7–13. 2012
- MENG et al., 2014 F. Meng, L. Ma, S. Ji, W. Yang, B. Cao. **Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* strain BY-3, a thermophilic and efficient cellulase-producing bacterium on untreated plant biomass** Lett. Appl. Microbiol., 59 (2014), pp. 306–312
- MILLER, G.L. **Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar**. Analytical Chemistry, v. 31, p. 426-428, 1959
- MORAIS, R. K. S.; ABUD, A. K. S. **Utilização de biossurfactantes produzidos a partir de resíduos agroindustriais na biorremediação do petróleo**. VOL. 8, NUM. 10, 2012.
- MULLIGAN, C; YONG, R; GIBBS, B. **Heavy metal removal from sediments by biosurfactants**. 2001.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. **Biossurfactantes: propriedades e aplicações**. Química Nova, v.25, n.5, p.772-776, 2002.
- PÉRICLES, L.F. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus* spp. em condição anaerobia**. 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Vicosa, Minas Gerais.
- SARUBBO, L.A.; MARÇAL, M.C.; NEVES, M.L.C.; SILVA, M.P.C.; PORTO, A.L F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. **Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica***. Appl Biochem Biotechnol, v. 95, p. 59-67, 2001.
- SHEPPARD, J.D; COOPER, D.G. **The response of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 to manganese during continuous-phased growth**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 35, p. 72-76, 1991.
- SINGH, A.; VAN HAMME, J.D.; WARD, O.P. **Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects**. Biotechnology Advances v.25, p.99–121, 2007.
- THOMPSON, D.N.; FOX, S.L.; BALA, G.A. **Biosurfactants from potato process effluents**. Appl. Biochem. Biotechnol, v. 87, p. 917- 930, 2000.
- WEBER, L.; DOGE, C.; HAUFÉ, G. **Oxygenation of Hexadecane in the Biosynthesis of Cyclic Glycolipids in *Torulopsis Apicola* Biocatalysis**, v. 5, p. 267, 1992.
- ZHANG F. ZHANG, S. YUEHUI, I.M. BANAT, L. CHAI, S. YI, G. YU, D. **Hou Potential microorganisms for prevention of paraffin precipitation in a hypersaline oil reservoir**, Energ. Fuel, 28 (2014), pp. 1191–1197
- ZOUARI, R; BESBES, S; CHAABOUNI, S; AYDI, D. **Cookies from composite wheat-sesame peels flour: Dough quality and effect of *Bacillus subtilis* SPN1 biosurfactant addition**. 2016.